

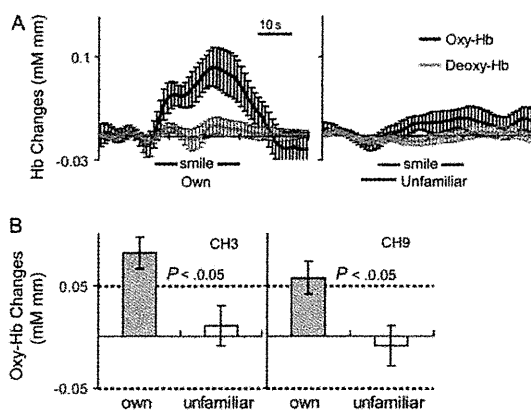
する。無表情の動画、笑顔の動画を 3 回繰り返し見せる。ただし繰り返し効果により血流変化が減少するため、4 回以上は繰り返さない。自分の子どもの動画だけでなく、他人の子どもの動画も見せて、脳血流変化の差が統計的に有意かを検証する。

騒音によるアーチファクトを減らすため、防音室で行った。

#### <結果>

26 組のうち、4 組は母の表情の変化がアーチファクトを起こし、3 組は母子分離ができず検査が行えなかった。

自分の子どもの動画を見た時の脳血流変化が、他人の子どもの動画を見たときの脳血流変化に比べて有意に大きかった。



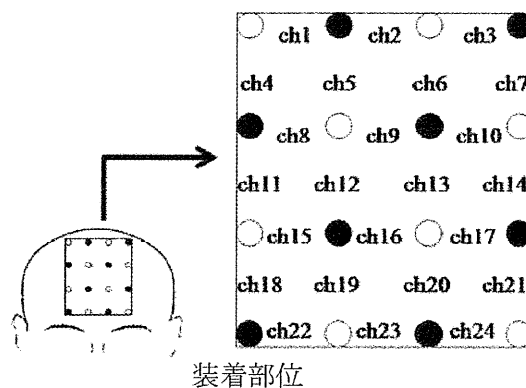
#### <方法>

体型、食事、母子愛着を想起させる静止画像を 5 枚ずつ用意する。画像の内容は次の通り。

体型：肥満児またはやせ児のイラスト  
 食事：チョコレートやケーキなどの高カロリー食の写真

母子愛着：母子が抱っこやキスをしている写真

写真は 1 枚あたり 15 秒間モニターに映し出され、見終わった後の写真までの間は 15 秒間休みがある。1 つのカテゴリー (5 枚) 見終わった後、1 分間の休みを置いて次のカテゴリーの写真を見る。それぞれのカテゴリーでの脳血流変化が、症例群と対照群で有意差があるかを検証する。



#### 【文献 2】

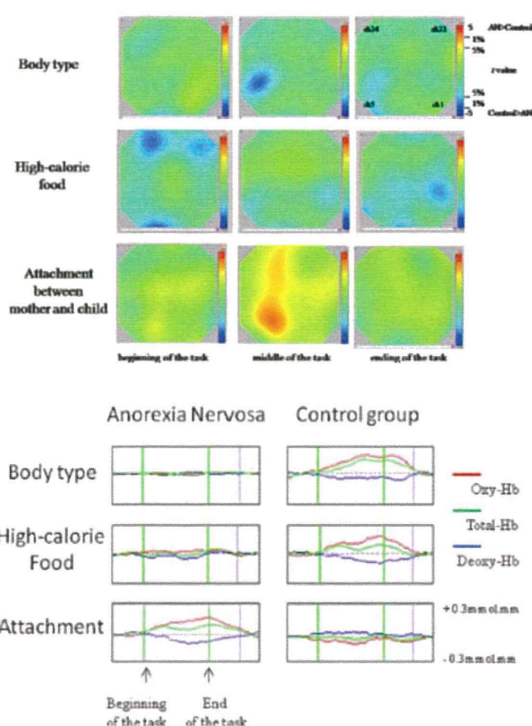
Nagamitsu et al, Brain and Development 2010, 32:162-167

#### <対象>

思春期の神経性食思不振症の女性 12 名と、年齢をマッチさせた対照群健康な女性 13 名。

#### <結果>

症例群では体型や食事を想起させる画像に対して脳血流の反応がなかった一方で、母子愛着の画像に対して反応した。対照群と逆の反応が見られた。



[Figure]Nagamitsu et al, BioPsychoSocial Medicine 2012, 6:7 より

## D 考察

### 1) 検査環境

NIRSは大脳表面付近の血流を測定しており、様々な感覚刺激の影響を受けやすい。従って測定中は騒音や余計な視覚刺激が入らないことが望ましい。Minagawa-Kawaiらが防音室で測定しているように、それに準ずる環境で検査を行う必要があると考えられた。

またMinagawa-Kawaiらの報告から、母子分離ができない月齢では、親子を分離-再統合する本研究においても中止せざるを得ないケースが多くなると予想され、人見知りの始まる前の生後6か月までを対象とすることが望ましいと考えられた。

脳血流は刺激を与えた数秒後から変

化が始まり、約30秒以内にピークを越えている。ノイズを最小限にするためには測定時間は短い方が望ましく、我々の研究でも再統合は30秒間で十分と考えられた。さらにNagamitsuらが1つのカテゴリー後に1分間の休息を挟んでいることは、変化した脳血流が定常状態に戻るために必要な時間と考えられ、異なる刺激の間には1分以上安静を保つ必要があると考えられた。

Minagawa-Kawaiらは刺激を最低3回繰り返しており、またNagamitsuらはカテゴリー内で5回の刺激を行っている。刺激を繰り返すことで再現性を評価していると考えられた。ただし繰り返し効果による変化の減少も指摘されており、2~3回程度の刺激が我々の研究においても最適ではないかと考えられた。

## E 結論

本研究における対象は生後6か月以下の乳児を持つ両親とし、NIRSによる脳血流測定は静かな環境下で、抱っこ30秒間、分離2分間を2回繰り返すという手順で今後行っていく方針とした。

## F 健康危険情報

該当なし

## G 研究発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

分担研究報告書

母子コホート研究による成育疾患等の病態解明に関する研究

分担研究項目：SGA の免疫学的機序に基づく病型分類と、  
アレルギー疾患の発症に関わる胎内因子の検索

分担研究者：松本 健治 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部  
免疫アレルギー研究部 部長

研究協力者：本村健一郎 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部  
医師 共同研究員

森田 英明 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部  
医師 共同研究員

小川 倫史 千葉愛友会記念病院 小児科 医師

研究要旨：近年、small-for-gestational-age (SGA)一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。以上から、本研究では①SGA の発症要因を解明するために網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、母胎側の遺伝子発現 profile では SGA 症例は特異な遺伝子発現パターンを示さなかったが、胎児面側の組織における遺伝子発現 profile は SGA と AGA で大きく異なり、その上 SGA 症例は3つの群に分かれる事が明らかとなった。②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響については、対象児がまだアレルギー疾患の好発年齢に達していない事から、解析を行っていない。

#### A. 研究目的

small-for-gestational-age (SGA)には明らかな基礎疾患や栄養障害などに起因する症例と、原因不明な症例が存在する。近年、原因不明のSGAの一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。本研究では実際にSGA 症例の胎盤の網羅的な遺伝子発現解析を行い、appropriate-for-gestational-age (AGA)と比較して、どの程度の頻度でどのような変化が生じているのかを検討する

また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。

以上から、本研究では①SGA の胎盤における遺伝子発現パターンの解析を行う。

②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響について検討する。

## B. 方法

①SGA 症例および正常産の胎盤から total RNA を抽出し、Agilent human Gene Expression microarray による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

②妊娠中の各種要因、特に食事やつわり、不正出血などの因子と臍帯血の好酸球数、児のアレルギー疾患の発症の相関について疫学的に検討する。

### (倫理的配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言 (1964 年) およびその改訂版に基づく倫理的原則、改訂 GCP (2003 年改訂) および「疫学研究に関する倫理指針(2007年8月16日厚生労働省告示、2007年11月1日施行)」等の関連法規を遵守して実施した。

1. 倫理審査: 臨床検体を用いる研究計画および臨床研究について、国立成育医療研究センターおよび千葉愛友会記念病院の倫理審査委員会による承認を得ている。

2. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人の個人情報の保護: 臨床検体を用いる研究においては、試料は個人情報管理者により連結可能匿名化されたのちに国立成育医療研究センター研究所に搬送され、実験に供される。個人識別情報は個人情報管理者により試料等採取機関にて管理され、研究実施機関には個人情報の伝達は行われない。

3. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益: 検体の採取の方法および研究の目的と内容について十分に説明する。研究計画は、対象患者の治療にとって直接利益をもたらすものではないこと、協力しないことによって何らの不利益も生じないことを説明する。

4. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人

に理解を求め同意を得る方法: 本研究の目的及び医学的貢献について対象患者あるいは代諾者に十分に説明した上で、各研究協力施設における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得る。

国立成育医療研究センターにて承認された倫理申請

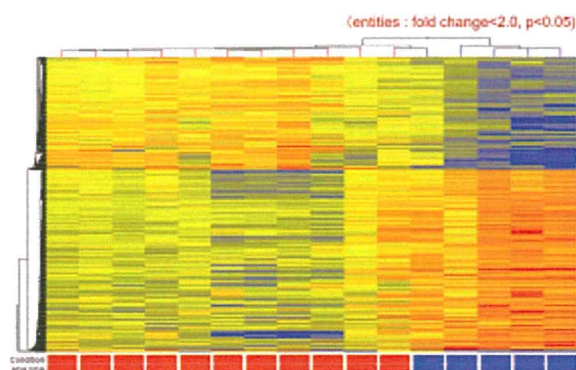
「アレルギー発症機序の解明に向けたアレルギー出生コホート研究と免疫ヒト化マウス作製 (受付番号 398)」

「多層的疾患オミックス解析による創薬標的の網羅的解析 (受付番号 476)」

## C. 結果

①SGA および AGA の胎盤を採取して total RNA を抽出し、microarray によって遺伝子の網羅的な発現 profile を比較検討した。まず、SGA 群 (5 例) と AGA 群 (11 例) の平均を比較して 2 倍以上の差が認められ、かつ  $p < 0.05$  となる遺伝子群を抽出し、クラスタリング解析を行った。その結果、母胎免側の遺伝子発現 profile は SGA と AGA の間で重複する部分もあり、また、SGA 症例の遺伝子発現パターンはほぼ単一であった。

Fig. 1 母体面側の遺伝子発現パターン

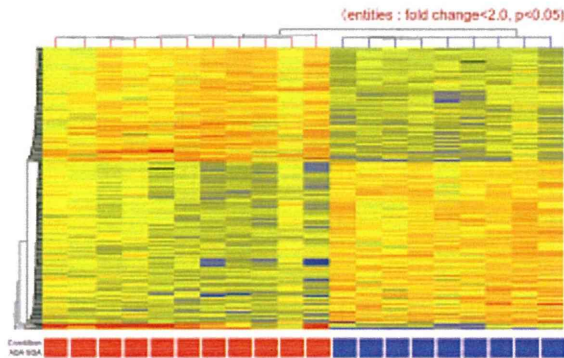


赤が AGA 症例、青が SGA 症例

一方、胎児面側の組織における遺伝子発現

profile は SGA 群 (9 例) と AGA 群 (11 例) で大きく異なり、その上 SGA 症例は 2 つの群に分かれる事が明らかとなった。

Fig. 2 胎児面側の遺伝子発現パターン



赤が AGA 症例、青が SGA 症例

②出生コホート研究に関しては、児がまだアレルギー疾患の好発年齢に達していない事から、解析を行う事が出来ない。

#### D. 考察

SGA は母胎面側 (脱落膜や絨毛) や、胎児側の組織の遺伝子発現に影響を与えるような異常によって起こる可能性が高い事が明らかとなった。また、胎盤の遺伝子発現パターンからは、SGA は複数の要因によって発症する症候である事が明らかとなった。今後は症例の臨床情報を精査して、病歴別の SGA 関連遺伝子群を検索することにより、原因不明の SGA の病型分類が出来る可能性があると考えられる。

#### E. 結論

胎盤の網羅的な遺伝子発現解析は SGA の原因究明の方法として有用であり、今後病態の発現に関連する遺伝子群が同定される事が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcεRI and FcγRII. Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, **Matsumoto K**, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. *Arthritis Rheum.* 65: 109-19, 2013.
2. Interleukin-33 in allergy. Ohno T, Morita H, Arae K, **Matsumoto K**, Nakae S. *Allergy.* 67: 1203-14. 2012.
3. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito S, **Matsumoto K**. *J Allergy Clin Immunol* 2012 in Press.
4. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, **Matsumoto K**, Nakae S. *J Immunol.* 189: 3641-3652, 2012.
5. Omalizumab inhibits acceleration of FcεRI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E. Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, **Matsumoto K**, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. *Ann*

- Allergy Asthma Immunol. 108: 188-194 e182, 2012.
6. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between Western countries and Japan. Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Curr Allergy Asthma Rep.* 12: 297-303, 2012.
  7. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, **Matsumoto K**, Nakae S. *Allergol Int.* 61:265-73, 2012.
  8. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF-alpha-activated human coronary artery endothelial cells. Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, **Matsumoto K**, Hirao Y, Munechika K, Abe J. *Eur J Immunol.* 42: 2121-31, 2012.
  9. Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis. Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Pediatr Dermatol.* 30: 17-22, 2013.
  10. Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis. Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Pediatr Dermatol.* 30: 29-35, 2012.
  11. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. Kashiwakura JC, Ando T, **Matsumoto K**, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. *J Clin Invest.* 122: 218-228, 2012.
  12. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, Abe J, **Matsumoto K**, Saito H. *Allergy.* 67: 799-803, 2012.
  13. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, **Matsumoto K**, Saito H. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 110: 39-43, 2013
  14. The association between oxytocin and social capital. Fujiwara T, Kubzansky LD, **Matsumoto K**, Kawachi I. *PLoS One.* 7:e52018, 2012.
  15. Role of Interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, **Matsumoto K**, Saito H. *Allergology Int* 2013 In Press.
  16. Pretreatment with low-levels of FceRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, **Matsumoto K**, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. *Int Arch Allergy Immunol* 2013 In Press.
2. 学会発表  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
分担研究報告書

体外受精妊娠と妊娠高血圧症候群発症のリスクとの関連に関する研究

（母子コホート研究における母体の予後研究、胎児の発育に関する研究）

研究分担者 国立成育医療研究センター周産期センター産科

渡辺典芳、谷口公介

研究要旨

前向きコホート研究である母子コホート研究において、体外受精（IVF）妊娠における妊娠高血圧症候群（PIH）の発症リスクの検討を行った。対象である、①多胎妊娠、②妊娠 16 週以降で初診、③胎児（新生児）構築異常合併例、④腎疾患・高血圧合併例を除外した 1254 例において、多変量ロジスティック回帰における PIH 発症のリスクは、オッズ比 2.61（95%信頼区間：1.16-5.89）で IVF 妊娠は有意な PIH 発症のリスクとなることが確認され、IVF 妊娠を取り扱う際には PIH 発症につき留意することが重要であると考えられた。

A 研究目的

近年少子高齢化が進み、母体出産年齢の高齢化が進んでいる。また生殖補助医療（ART）の進歩および合併症を取り扱う診療の進歩によりハイリスク妊娠率の増加も認められる。本母子コホート研究においてはこれらの高齢妊娠・ART 妊娠・ハイリスク妊娠の母児転帰および周産期管理が母児転帰に及ぼす影響を前向きに検討することを目的としている。妊娠前・妊娠中の介入についての最初のアウトカムとしては、分娩時の母児の転帰ということになる。

妊娠高血圧症候群（Pregnancy-induced Hypertension：以下 PIH）は妊娠中の母児の転帰に重篤な影響を及ぼしうる合併症であるが、海外からの前向き観察研究での報告では体外受精（以下 IVF）での妊娠は PIH 発症のリスクを増加させるとの報告がなされている（Obstet Gynecol 2005; 106(5 Pt

1): 1039-1045.）。しかし、本邦においての IVF 妊娠と PIH 発症のリスクとの関連の報告は少ない。

PIH の発症は多因子であり、様々な要因（社会経済背景・教育歴・合併症など）が交絡因子となりうる。本母子コホート研究においては、妊娠初期より多因子の情報収集を行っていること、また単一施設であるため臨床情報のバイアスが少ないというメリットがある。また、不妊治療後の妊娠において、父親の要因は主要な交絡因子となりうる可能性があり、父親の情報も同時に収集している本コホート研究は IVF 妊娠の転帰の検討においては有用であると考えられる。

以上のような背景を元に、本研究では IVF 妊娠と PIH 発症リスクとの関連を検討することを目的とした。

B 研究方法



母子コホート研究への参加者で、2012年9月30日までに分娩した1508症例の内、①多胎妊娠、②妊娠16週以降で初診、③胎児（新生児）構築異常合併例、④腎疾患・高血圧合併例を除外した1254例を対象とした。

妊娠高血圧症候群（PIH）は、血圧140/90 mmHgが連続して記録された状態で診断は国立成育医療研究センター周産期センター医師により行われた。妊娠高血圧腎症（子癩前症：preeclampsia）はPIH症例の内で尿蛋白が持続して陽性となる症例で診断された。

まず、IVF妊娠症例と非IVF妊娠症例において、PIHおよびpreeclampsia発症の頻度を比較し、次いで多変量ロジスティック回帰分析を行いIVF妊娠の非IVF妊娠に対するリスクの検討を行った。

#### C 研究結果

対象症例1254例中で、IVF妊娠は226例（18%）、非IVF妊娠は（82%）であった。背景の比較は表1に示す。IVF群と非IVF群の比較において、背景で有意な差を認めしたのは、年齢（ $38.4 \pm 3.2$  vs.  $35.2 \pm 4.1$  歳,  $p < 0.001$ ）、初産妊娠（78.3% vs. 52.5%,  $p < 0.001$ ）、結婚年齢（ $30.8 \pm 4.3$  vs.  $29.8 \pm 4.2$ ,  $p < 0.001$ ）、所得（800万円/年以上）（71.7% vs. 55.7%,  $p < 0.001$ ）、甲状腺機能低下症合併（6.2% vs. 3.0%,  $p = 0.028$ ）、配偶者年齢（ $40.6 \pm 4.7$  vs.  $37.6 \pm 4.9$ ,  $p < 0.001$ ）であった。

対象1254症例におけるPIH発症は45（3.6%）、preeclampsia発症は21（1.7%）であった（表2）。IVF群では非IVF群に比較してPIH発症は有意に高率であった

（7.1% vs. 2.8%,  $p = 0.004$ ）。また、Preeclampsia発症もIVF群で有意に高率であった（4.4% vs. 1.1%,  $p = 0.002$ ）。

IVF妊娠のPIH発症リスクの検討の目的で行った多変量ロジスティック回帰分析（年齢、経産回数、高血圧家族歴、収入、結婚年齢、甲状腺機能低下症合併を調整）での、オッズ比は2.61（95%信頼区間：1.16-5.89）であった。Preeclampsiaに関する同様の解析でもオッズ比は4.70（95%信頼区間：1.49-14.8）であり、IVF妊娠が有意なリスクであることが示された。

#### D 考察

本研究においてIVF妊娠は非IVF妊娠との比較で、有意にPIH発症のリスクが高いことが示された。2004年に報告されたIVF妊娠と妊娠転帰との関連のメタアナリシスでは、Preeclampsia発症のオッズ比1.55（95%信頼区間：1.23-1.95）であると報告されている（Obstet Gynecol 2004）。この報告においては、検討された研究のほとんどが後方視的データベースを用いたものであり、解析においての交絡因子の調整が限られている（年齢、人種など）という問題点があった。その後、行われた前向き観察研究による報告（Obstet Gynecol 2005; 106(5 Pt 1): 1039-1045.）では、Preeclampsiaの発症リスクはオッズ比2.7（95%信頼区間：1.7-4.4）と報告され、交絡因子の調整もそれまでの研究より詳細に行われ、IVF妊娠とPreeclampsiaの発症リスクが改めて示された。

本研究で示された多変量モデルにおけるオッズ比はPIH全体では2.61（95%信頼区間：1.16-5.89）、Preeclampsiaに限ると4.70

・(95%信頼区間：1.49-14.8) とこれまでの報告と同様に IVF 妊娠は有意な PIH・Preeclampsia 発症のリスクであることが確認された。今回の研究では、背景として身体所見に加えて、社会経済要因も交絡因子として検討を行った。さらに、父親の要因も同時に行うことで、IVF と PIH・Preeclampsia の関連をより詳細に検討できたということが本研究の強みであると思われる。

しかし、IVF の手技そのものが PIH・Preeclampsia の原因になるか、ということに関しては、調整する交絡因子をどれだけ増やしても正しく確認することには限界があると思われる。理想的には IVF そのものについてのランダムコントロール研究を行う必要があるが、理論的にあり得ないため、最終的な結論としては「IVF が PIH・Preeclampsia 発症のリスクとなる」ではなく、「IVF 妊娠においては PIH・Preeclampsia 発症のリスクが高い」ということになるであろう。

今後は疫学的手法も含め、基礎的検討も加え様々な方法で IVF 妊娠と PIH・Preeclampsia との関連が検討される必要があると考えられる。

## E 結論

本研究により IVF 妊娠は PIH (preeclampsia を含む) 発症のリスクを増加させることが確認された。IVF 妊娠を管理する際には PIH 発症につき留意する必要があると考えられた。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

なし (全エントリー症例の分娩終了を待って、再解析し学会発表・論文発表予定)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

## (引用文献)

1 Assisted reproductive technology and pregnancy outcome.

Shevell T, Malone FD, Vidaver J, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Hankins GD, Eddleman K, Dolan S, Dugoff L, Craigo S, Timor IE, Carr SR, Wolfe HM, Bianchi DW, D'Alton ME.

Obstet Gynecol. 2005 Nov;106(5 Pt 1):1039-45.

2 Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis.

Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS.

Obstet Gynecol. 2004 Mar;103(3):551-63.

表 1 症例背景

	All patients n=1254	non-IVF n=1028	IVF n=226	p value
Age	35.8±4.1	35.2±4.1	38.4±3.2	<b>&lt;0.001</b>
Primi-parous	717 (57.2%)	540 (52.5%)	177 (78.3)	<b>&lt;0.001</b>
Height	159.4±5.4	159.4±5.4	159.6±5.3	0.62
Weight before pregnancy	51.7±7.2	51.6±7.3	52.1±6.6	0.37
BMI before pregnancy	20.3±2.5	20.3±2.6	20.4±2.2	0.44
Family history of Hypertension	325 (26.0%)	255 (24.9%)	70 (31.0%)	0.057
Family history of Diabetes Mellitus	172 (13.7%)	138 (13.5%)	34 (15.0%)	0.53
Smoking	30 (2.4%)	27 (2.6%)	3 (1.3)	0.34
Marriage age	30.0±4.2	29.8±4.2	30.8±4.3	<b>&lt;0.001</b>
Income				<b>&lt;0.001</b>
< 4 million yen/year	72 (6.7%)	62 (7.1%)	10 (5.2%)	
4-8 million yen/year	370 (34.6%)	325 (37.2%)	45 (23.2%)	
8-15 million yen/year	495 (46.4%)	395 (45.2%)	100 (51.6%)	
15 million yen/year <	131 (12.3%)	92 (10.5%)	39 (20.1%)	
Education				0.063
High school	79 (7.0%)	68 (7.5%)	10 (5.0%)	
Special school	130 (11.7%)	115 (12.6%)	15 (7.6%)	
College (2 year)	206 (18.6%)	161 (17.7%)	45 (22.7%)	
University	694 (62.6%)	566 (62.2%)	128 (64.7%)	
Complications				
Asthma	47 (3.8%)	39 (3.8%)	8 (3.5%)	>0.99
Diabetes Mellitus	5 (0.4%)	5 (0.5%)	0 (0%)	0.59
Basedow	35 (2.8%)	27 (2.6%)	8 (3.5%)	0.50
Hypothyroid	45 (3.6%)	31 (3.0%)	14 (6.2%)	<b>0.028</b>
Collagen disease	18 (1.4%)	17 (1.7%)	1 (0.4%)	0.23
Atopic skin disease	29 (2.3%)	23 (2.2%)	6 (2.7%)	0.63
Mental disease	25 (2.0%)	18 (1.8%)	7 (3.1%)	0.19
Cardiovascular disease	7 (0.6%)	5 (0.5%)	2 (0.9%)	0.62

**Father's information**

	All patients n=1254	non-IVF n=1028	IVF n=226	p value
Age	38.1±5.0	37.6±4.9	40.6±4.7	<b>&lt;0.001</b>
Height	173.0±5.7	173.1±5.7	172.8±5.7	0.41
Weight	70.0±9.7	70.1±9.7	69.6±9.6	0.53
BMI	23.4±2.9	23.4±3.0	23.3±2.9	0.77
Education				0.96
High school	94 (8.5%)	78 (8.7%)	15 (7.6%)	
Special school	103 (9.3%)	84 (9.3%)	19 (9.6%)	
College (2 year)	6 (0.5%)	5 (0.6%)	1 (0.5%)	
University	902 (81.6%)	739 (81.5%)	163 (82.3%)	

表 2-1 妊娠高血圧症候群の発症頻度と体外受精

	All patients n = 1254	non-IVF n=1028	IVF n=226	p
PIH	45 (3.6%)	29 (2.8%)	16 (7.1%)	0.004
Preeclampsia	21 (1.7%)	11 (1.1%)	10 (4.4%)	0.002

表 2-2 PIH

	unadjusted Odds Ratio	95% CI	adjusted* Odds Ratio	95% CI
non-IVF	ref	-	ref	-
IVF	2.63	1.41-4.94	2.61	1.16-5.89

\* Adjusted for age, parity, family history of HT, income, marriage age, and hypothyroidism

表 2-3 Preeclampsia

	unadjusted Odds Ratio	95% CI	adjusted* Odds Ratio	95% CI
non-IVF	ref	-	ref	-
IVF	4.28	1.79-10.2	4.70	1.49-14.8

\* Adjusted for age, parity, family history of HT, income, marriage age, and hypothyroidism

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
分担研究報告書

マウス肝臓における遺伝子発現とDNAメチル化の網羅的解析

分担研究者 小川 佳宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野 教授

**研究要旨** 多くの疫学調査により、胎生期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている（Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD）。一方、胎生期のみならず個体の成長が著しい新生児期も全身臓器の可塑性が高い時期であり、新生児期の栄養環境が成人期の肥満や生活習慣病の疾患感受性に影響を与える可能性がある。本研究は、従来知見のなかった新生児期の肝臓における*de novo*脂肪合成のエピジェネティクス制御の分子機構の解明を目指す新しい試みである。本研究では、出生後の栄養環境変化に応じて変化する肝臓脂肪合成の分子機構に着目し、肝臓の中性脂肪合成の律速酵素Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1（GPAT1; *Gpam*）遺伝子のDNAメチル化制御の可能性を検討した。マウス肝臓の*Gpam*のプロモーター領域は、成獣と比較して新生仔でDNAメチル化が高く、遺伝子発現と逆相関した。成獣の肝細胞（初代培養）において、*Gpam*プロモーターをDNAメチル化することにより転写因子SREBP-1cのプロモーターへのリクルートとGPAT1の遺伝子発現が減少し、中性脂肪合成が低下した。また、*Gpam*はDNAメチル化酵素Dnmt3bによりDNAメチル化された。さらに、胎仔期～新生仔期における母獣の過栄養の環境が新生仔の*Gpam*プロモーターのDNAメチル化を減少させた。以上より、肝臓の中性脂肪合成の律速酵素GPAT1は新生仔期にDNAメチル化によるエピジェネティックな制御を受けることが明らかとなった。さらに、本研究により、DNAメチル化の網羅的解析法であるMIAMI法（*Oncogene* 25: 3059-3064, 2006）の導入を完了し、胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓におけるDNAメチル化状態の網羅的な解析を開始している。

### 研究目的

生活習慣病の発症には塩基配列の変化による遺伝素因のみならず栄養環境を含む環境因子が関与することが知られており、分子基盤の一つとしてエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が指摘されている。しかしながら、栄養環境によりエピジェネティクス制御を受ける標的遺伝子は同定されていない。本研究は、生活習慣病の病態に密接に関連する肝臓において胎仔期～授乳期の遺伝子発現変化およびDNAメチル化変化を網羅的に解析し、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにするものである。

### 研究方法

1. 授乳期～離乳期における肝臓脂肪合成遺伝子の発現変化  
新生仔及び成獣の雄性 C57BL6 マウス肝臓を用い、*Gpam* を含む複数の脂肪合成関連遺伝

子のDNAメチル化状態と遺伝子発現を解析した。

2. 脂肪合成酵素遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造の解析  
*Gpam* のプロモーター領域へのDNAメチル化酵素のリクルート及びヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。
3. 培養細胞を用いたDNAメチル化によるプロモーター活性抑制の解析  
初代培養肝細胞を用い、*Gpam* プロモーターのDNAメチル化による、SREBP-1cのリクルートと中性脂肪合成の変化を解析した。
4. 母獣の栄養変化による仔マウスの遺伝子発現調節の検討  
妊娠・授乳期間中の母マウスを高脂肪・高シヨ糖食により飼育して過栄養状態とし、出生仔の*Gpam* のDNAメチル化状態を解析した。

## 5. 肝臓における遺伝子発現と DNA メチル化パターンの網羅的解析

胎生期～新生仔期～成獣期のマウス肝臓における遺伝子発現とプロモーター領域の DNA メチル化を網羅的に解析するため、MIAMI 法 (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) を導入した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を獣医学的に認められた方法を用い、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

### 研究結果

1. マウスの肝臓における中性脂肪合成は、新生仔で低く、成獣で高かった。新生仔マウス肝臓において、脂肪合成のマスターレギュレーター転写因子 SREBP1-c は発現しているにも関わらず、そのターゲットである律速酵素遺伝子 *Gpam* の発現は非常に低かった。新生仔では、*Gpam* プロモーターの SREBP 応答配列 (SRE) (GPAT1-SRE) 周辺領域の DNA が高メチル化状態にあるのに対して、成獣では、メチル化が低く、メチル化の程度が遺伝子発現と逆相関した。レポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法により、GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が SREBP-1c のリクルートを阻害することにより、SREBP-1c による転写活性化を直接抑制することが明らかとなった。
2. クロマチン免疫沈降法による解析の結果、新生仔マウスの肝臓では DNA メチル化酵素 Dnmt3b が GPAT1-SRE 周辺領域にリクルートされる一方、成獣期の肝臓ではリクルート量は著しく低下していた。更に、新生仔期には GPAT1-SRE 周辺領域は転写抑制型のヒストン修飾 (H3K9 メチル化) を受けるが、成獣期には転写活性型のヒストン修飾 (H3K4 メチル化、H3K9 アセチル化) を受けることが明らかになった。
3. 初代培養肝細胞を用い、GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化と中性脂肪合成に与える、

Dnmt3b 及び DNA メチル化の役割を解析した。Dnmt3b 過剰発現により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化され、SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現が減少し、さらに中性脂肪合成が低下した。

4. 妊娠～授乳期間中の母マウスを高脂肪・高シヨ糖食により飼育し、過栄養の栄養環境が、仔マウス肝臓の DNA メチル化に与える影響を解析した。過栄養群の仔マウスでは、新生仔期に GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が低下しており、SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現、肝臓中中性脂肪含量の増加が認められた。
5. ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 *HpaII* およびメチル化非感受性制限酵素 *MspI* で処理後、PCR 法により 2 サンプル間で切断に差異のある領域を増幅し、DNA アレイにより検出する系を確立することができた。胎生期～新生仔期～成獣期のマウス肝臓のゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化の差異の有無に関して予備検討を開始した。

### 考察

以上の結果より、次のようなモデルが考えられる。新生仔期の肝臓では、Dnmt3b により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化されることにより、SREBP-1c のリクルートが阻害され、GPAT1 の遺伝子発現が誘導されない。一方、離乳期には脱メチル化されて SREBP-1c がリクルートされるようになり、脂肪合成の律速酵素である GPAT1 の遺伝子発現が誘導され、脂肪合成が行われるというものである。DNA 脱メチル化の分子機構の解明は今後の課題であるが、過栄養にした母マウスより産まれた仔マウスを用いた検討により、少なくとも一部は栄養環境の影響を受けるものと考えられる。

本研究は、新生仔マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化制御に関する最初の発見である。可塑性の高い胎児期・新生児期の代謝臓器において、栄養環境に応じて変化する代謝機能にエピジェネティクス制御が果たす役割を解明することにより、胎児期から新生児期の栄養環境の変化が成人後の生活習慣病の発症を左右する分子機構を知る手掛かりとなることが期待される。

## 結論

本研究により、*de novo* 脂質合成の律速酵素である GPAT1 遺伝子は DNA メチル化により発現制御を受けることが示唆された。今後、新生仔～成獣マウスの肝臓サンプルについて DNA メチル化と遺伝子発現の網羅的な解析を進める予定である。

## \*健康危険情報

なし

## 研究発表

### 論文発表

1. Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M, Ogawa Y. Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. **Diabetes** 61: 2442-2450, 2012.
2. Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The

Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. **Diabetes** 61: 1199-1209, 2012.

### 学会発表

1. 亀井康富、江原達弥、高橋真由美、袁勲梅、金井紗綾香、山崎聖美、江崎治、菅波孝祥、岡野正樹、小川佳宏：「マウス新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子の DNA メチル化制御」 日本栄養食糧学会 2012年5月 仙台
2. 江原達弥、亀井康富、高橋真由美、袁勲梅、金井紗綾香、田村江梨奈、田中都、山崎聖美、三浦進司、江崎浩、菅波孝祥、岡野正樹、小川佳宏：「マウス新生仔の肝臓における脂肪合成酵素 GPAT1 の DNA メチル化による遺伝子発現制御」 第33回日本肥満学会 2012年10月 京都

### 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 分担課題:周産期異常のコホート研究体制の確立

研究分担者 齋藤滋 富山大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 教授

### 研究要旨

周産期の疾患は、多彩な病因病態を背景に持つため、前方視的、疫学的な研究体制による要因の分析と対策の構築は、今後の周産期医療の発展に必要不可欠である。本研究班では、前向きコホート研究デザインにより、妊産婦の細菌性膣症・頸管炎等の「感染性要因」、喫煙・ダイエット、就労状況等の「ストレス要因」、不妊治療等の「医原性要因」、そして「遺伝的要因」について全国規模の調査を行ってデータベースを構築し、前方視的に周産期における疾患(早産や低出生体重児等)のリスク因子を抽出した。現在までに 1810 名の妊婦が登録され、1592 例が分娩している。子宮頸管長のデータが欠損していた 227 例を除いた 1365 例で検討したところ、妊娠 34 週未満の早産のリスク因子は、妊娠 20-24 週の頸管長の短縮と胎児性別が男児であることであった。妊娠 37 週未満の早産のリスク因子はパートタイム勤務、子宮筋腫、ステロイド剤の内服、頸管長の短縮であった。

### A. 研究目的

日本における早産・低出生体重児の「感染性要因」「ストレス要因」「医原性要因」等の諸要因を、前方視的な全国調査により早産・低出生体重児と最も関連する因子を抽出し、早産、低出生体重児予防に向けた具体的な対応策を提言することを目的とする。併せて、日本各地におけるデータベースを構築して 10 年後、20 年後の状況と比較できる基礎資料を作成する。

### B. 研究方法

#### 1. 研究デザイン

前向きコホート研究を行い、妊婦初期に妊産婦を登録し種々の要因を調査した上で、早産・低出生体重児と関連する因子を抽出し、併せてデータベースを構築する。

#### 2. 研究対象

以下の選択基準を全て満たす妊産婦を対象とする

- (1) 妊娠 13 週 0 日未満に受診した妊産婦
- (2) 本試験の参加にあたり、詳細な説明をけた後、その主旨を十分に理解し、自筆による同意文書が得られた妊産婦(20 歳未満の場合は配偶者(20 歳以上の)または親権者の文書同意が

得られた者)

除外基準

- (1) 妊娠 22 週 0 日までに流産に至った症例
- (2) 担当医師が不適切と判断した場合  
中止・脱落基準
- (1) 本研究から離脱するとの申し入れがあった場合
- (2) 妊娠経過中連絡が取れない、もしくは受診しなくなった場合

#### 3. 研究のアウトライン

##### 1) 問診表による背景因子の調査

外来担当医が研究の説明を行なった後に、研究に同意していただいた参加者に同意書を手渡し、記載していただく。担当医は登録番号を記載し、データをインターネット経由で入力する。問診表は第 3 者への開示はせず電子カルテにも記載しない。参加施設代表者は責任を持って問診表を管理し、情報の漏洩がないようにする。

##### 2) 観察スケジュール

初診時(妊娠 12 週 6 日まで)  
問診表を参加者に手渡し、担当医師が情報を記載する。

- ① 身長
- ② 体重(非妊時)
- ③ 妊娠歴(流・早産歴、死産歴、FGR 歴、妊娠高血圧既往歴)
- ④ 円錐切除術歴の有無
- ⑤ 嗜好(喫煙、飲酒)
- ⑥ 不妊治療の有無
- ⑦ 子宮内妊娠の確認
- ⑧ 母体基礎疾患の有無
- ⑨ 収入、教育歴、労働環境、服薬歴の確認

#### 妊娠 8～12 週

- ① 頸管分泌物 Gram 染色(タッチスメア)  
(Nugent score、ラクトバチルス<sup>+</sup>の消失、好中球増加)「三菱化学メディエンス(株)に依頼した。」
- ② 超音波断層法による妊娠週数の確定
- ③ 感染症のチェック

#### 妊娠 20～24 週

- ① 頸管分泌物 Gram 染色「三菱化学メディエンス(株)に依頼した。」
- ② 頸管粘液の採取(IL-8, IL-6, sIL-6R, Cp, fFN, IGF-BPI, Lf 測定、GE 測定、プロテオミクス解析)
- ③ 子宮頸管長の測定

#### 妊娠全期間

- ① 妊娠合併症の有無

#### 分娩後

- ① 分娩週日(早産の際は人工早産か自然早産か)
- ② 分娩時母体年齢
- ③ 分娩時母体体重、体重増加
- ④ PROM の有無
- ⑤ 単胎妊娠か多胎妊娠か
- ⑥ 分娩様式
- ⑦ 陣痛促進剤の有無
- ⑧ 早産例、低出生体重児には、卵膜、胎盤(脱落膜、絨毛膜、羊膜を含む)、臍帯の病理を提出する。絨毛膜羊膜炎の評価は Blanc の分類で、臍帯炎の評価は中山の分類(中山雅弘他 産婦治療 56: 410-413, 1988)で行なった。
- ⑨ 臍帯血 2ml
- ⑩ 母体末梢血 2ml

#### 新生児

- ① 胎数
- ② 性別
- ③ 身長
- ④ 体重
- ⑤ 頭周囲径
- ⑥ 胸囲
- ⑦ Apgar 値
- ⑧ 胎盤重量
- ⑨ LFD(SGA), AFD(AGA), HFD(LGA)の有無
- ⑩ 児の転帰
- ⑪ 児の NICU 管理有無
- ⑫ 児の合併症
- ⑬ 新生児の転帰

#### 4. 倫理面への配慮

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。本研究内容は、富山大学臨床・疫学研究等に関する倫理審査委員会の承認を受けた(富山大学臨床・疫学研究等に関する倫理審査委員会 承認番号 臨認22-31号)。

#### C. 研究結果

初年度は、主に検体収集体制の構築を行った。研究協力機関7箇所、すでに本研究を行うための倫理申請承認を終了し、検体の収集が開始されている。また、研究告知の為のパンフレット等を作成した。

次年度からはこれらの体制により検体収集を行い、合計 1810 症例を収集した。1810 例のうち、分娩後の詳細なデータが得られなかった 218 例を除き、さらに妊娠 20-24 週の子宮頸管長の測定が行なわれなかった 227 例を除いた 1365 例で解析した。データは、まず単変量解析を行ない、その後 multiple logistic regression 法を行ない、P 値が 0.05 以下を有意差ありとした。1365 例中 34 週未満早産率は 1.5%(20/1365)、37 週未満早産率は 8.9%(122/1365)であった。

まず、妊娠 34 週未満早産のリスク因子につき検討した。社会経済的な因子として、中学卒例の早産率が 25%(1/4)と単変量解析では有意に高率であった( $p < 0.001$ )が、多変量解析では、有意差はなくなった。過去の早産歴も単変量解析では

2.4%(11/461)と早産歴のない症例での 34 週未満早産率が 0.8%(9/1100)に比し、有意( $p=0.036$ )に高値であったが、多変量解析では有意差が消失した。胎児の性別が男児であった場合の 34 週未満早産率 2.1%(17/821)は、女児である場合の値 0.4%(3/765)に比し、有意に( $p=0.0056$ )高値であり、多変量解析でも胎児性別が女児であった場合のオッズ比 0.18、95%CI (0.05-0.63)と有意な差であった。妊娠 20-24 週の頸管長短縮は、単変量、多変量解析とも有意なリスク因子であり、頸管長 20mm、25mm、30mm、35mm 未満の 34 週未満早産率は、それぞれ 50%、33.3%、13.9%、4.9%と高率であった。次に、妊娠 37 週未満の早産のリスク因子につき検討した。その結果、仕事がパートタイム勤務である症例の早産率は 13.5%(30/222)と、専業主婦の値 6.6%(45/677)、フルタイム勤務の値 7.1%(46/645)に比し、有意に高値であった。多変量解析においてもオッズ比 2.05、95%CI (1.24-3.38)と有意な( $p=0.0053$ )リスク因子であった。

既往歴では、子宮筋腫合併例で早産率が 15.7%と単変量解析で有意に高率で( $p=0.018$ )、多変量解析でもオッズ比 2.43、95%CI (1.16-5.08)と有意なリスク因子であった。

服用製剤では、ステロイド剤(自己免疫疾患例や気管支喘息例であり、切迫早産例での胎児肺成熟を目的とした症例は除外した。)ならびに降圧剤使用群での早産率が 46.7%(7/15)、50%(6/12)と有意に高値となったが、多変量解析ではステロイド剤内服は、オッズ比 7.31、95%CI (2.21-24.20)と有意なリスク因子となり、降圧剤使用ではオッズ比 5.27、95%CI (0.95-29.21)と高い傾向( $p=0.056$ )があった。

妊娠 20-24 週時の頸管長短縮は、単変量、多変量解析とも有意( $p<0.001$ )なリスク因子であり、頸管長 20mm、25mm、30mm、35mm 未満での早産率は、それぞれ 75%、41.7%、23.6%、13.1%と高率であった。

その他、収入、細菌性膣症、喫煙、飲酒歴、頸管中 IL-8 値などは、早産のリスク因子ではなかった。

#### D. 考察

社会的経済因子、過去の既往歴、タバコやアルコール等の嗜好歴、細菌性膣症、頸管炎、頸管長、胎児性別等の因子が、日本人の早産の

リスク因子となるかについては、大規模な成績はこれまでに報告されておらず、本研究が初めてのものとなる。その中で判明したことは、パートタイム勤務が 37 週未満のリスク因子であることである。パートタイム勤務は日当制であり、妊娠期間中に切迫早産徴候があっても、十分に安静を保てない可能性がある。パートタイム勤務者の妊婦に対しては、きめ細かい指導と、場合によっては休職をして、自宅安静を勧めたり、入院が必要な際は、入院させる等の対策が必要となろう。また胎児が男児である場合、早産が多いことは、諸外国でも報告されており、超音波診断で、あらかじめ胎児性別を確認しておくメリットがある。子宮筋腫合併例、ステロイド剤内服では、早産のリスク因子となることは、これまでも知られていたが、今回の成績でも再確認され、産科診察においても十分に留意する必要がある。

子宮頸管長短縮は、妊娠 20-24 週 25mm 以下がリスク因子とされてきたが、今回の成績では 35mm 未満が早産リスク因子であることが判った。もちろん頸管長 25mm 未満では早産率が 41.7%と高率ではあるが、25-35mm の症例に対しても、力仕事等の負担を避けること、腹緊時には横になること、頻回な子宮収縮時には、産婦人科外来を受診するように指導することも、早産減少のためには有用であろう。今回の検討では、ゲノム解析は行えなかったが、これらの因子とゲノム因子とを組み合わせた早産のリスク因子の解明が必要であろう。ただし、臨床検体は保存してあるので、症例が累積された段階で、解析を行なう予定である。

#### E. 結論

周産期の前向きコホート研究は、国内で類似の研究が少なく、ヒトゲノム・遺伝子解析を併せて行う研究は類例がない。本研究の遂行によって質の高いバイオリソースを構築し、データベース化された臨床情報と遺伝情報の疫学解析を行うための基盤体制が構築された。今回の成績で頸管長の短縮、児が男児であること、パートタイム勤務、子宮筋腫合併妊娠、ステロイド剤内服、妊娠 20-24 週時の頸管長短縮がリスク因子となった。今後、遺伝的な早産リスク因子との交絡を明らかにしたい。

## F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shiozaki A, Matsuda Y, Satoh S, Saito S. Comparison of risk factors for gestational hypertension and preeclampsia in Japanese singleton pregnancies. JOGR in press. 2012 Sep 25. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01990.x.
  - 2) Darmochwal-Kolarz D., Saito S., Tabarkiewicz J., Kolarz B., Rolinski J., Leszczynska-gorzela B., Oleszczuk J.. Apoptosis Signaling Is Altered in CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Lymphocytes in Pre-Eclampsia. Int. J. Mol. Sci. 13: 6548-6560, 2012.
  - 3) Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. The Balance of the Immune System between T Cells and NK Cells in Miscarriage. Am J Reprod Immunol. 67:304-310, 2012.
  - 4) Toldi G., Saito S, Shima T., Halmos A., Veresh Z., Vászárhelyi B., Rigó J., Molvarec A. The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 68:175-80, 2012.
  - 5) Li LP, Fang YC, Dong GF, Lin Y, Saito S. Depletion of Invariant NKT Cells Reduces Inflammation-Induced Preterm Delivery in Mice. J Immunol. 2012;188:4681-4689. doi:10.4049/jimmunol.1102628
  - 6) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. : Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158A:1670-5.
  - 7) 塩崎有宏, 齋藤滋: 膣炎, 頸管炎, 細菌性膣症と早産対策.産婦人科の実際 61:563-569, 2012.
  - 8) 米田 哲, 齋藤 滋: リトドリン塩酸塩の後発医薬品から先発医薬品に切り替えて妊娠を継続しえた早産ハイリスク妊婦の2症例. 産婦人科の実際. 61:1395-1399, 2012.
- ### 2. 学会発表
- 1) Saito S: The role of regulatory T cells and regulatory NK cells during pregnancy. The Congress of the Hungarian Society for Reproductive Immunology, 2012, 12, 12, Pécs, Hungary.
  - 2) Saito S: The pathophysiology of poor placentation in preeclampsia. The 200th anniversary of Dept of Obstet. and Gynecol, Semmelweis University foundation, 2012, 12, 10, Budapest.
  - 3) Saito S: Impaired autophagy of extravillous trophoblast (EVT) by soluble endoglin may disturb EVT invasion and vascular remodeling. 8th International Workshop Reunion reproductive immunology, immunological tolerance and immunology of preeclampsia. 2012, 11, 26-29, Reunion Island.
  - 4) Saito S: No maternal death caused by pandemic (H1N1) 2009 in Japan. The second isirv-Antiviral Group Conference in conjunction with NIHE, 2012, 10,29-31, Hanoi.
  - 5) Saito S: Novel methods to detect infection for predicting the prognosis of preterm birth. American Society for Reproductive Immunology (ASRI) 's Second Clinical Reproductive Immunology Symposium, 2012, 10,27-28, Providence (Invited).
  - 6) Saito S.: How does the maternal immune